

## DNA-diagnostiek en Mozaïek

Rede uitgesproken door

**Prof. dr. E. Bakker**

bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar  
op de vakgebied van de moleculair genetische diagnostiek,  
in het bijzonder van de kiembaanafwijkingen  
aan de Universiteit Leiden  
op 15 maart 2002.



Mijnheer de Rector magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

Moleculair genetische diagnostiek in het bijzonder van de kiembaanafwijkingen kan vertaald worden in DNA-diagnostiek van erfelijke aandoeningen.

Erfelijke aandoeningen komen in families voor en erfelijke aandoeningen ontstaan nieuw.

De titel van mijn betoog vanmiddag DNA-diagnostiek en Mozaïek sluit daarbij aan. Juist nieuw ontstane erfelijke afwijkingen beginnen vaak als mozaïek.

Dat de grens tussen het wel of niet erfelijk zijn anders ligt dan we tot nu toe aannamen, zal u vanmiddag duidelijk worden. In ieder geval zult u leren dat ieder van ons meerdere foutjes in het DNA heeft. Een aantal van deze foutjes, ook wel mutaties of gendefecten genoemd, zijn nieuw ontstaan.

Nieuwe gendefecten komen vaak eerst als mozaïek voor.

Volgens de dikke van Dale is een mozaïek een inlegwerk van steen of glas. Vaak betreft het dan een bonte mengeling van verschillende kleuren.

Ook binnen de Genetica wordt het woord mozaïek gebruikt om een bonte mengeling aan te duiden. Het gaat dan over een mengeling van twee genetisch iets verschillende celpopulaties. Het verschil tussen deze twee celpopulaties is ontstaan tijdens de groei van het embryo ten gevolge van een kopieer- of delings-foutje.

(Eén eeuw genetica van de mens)

Sir Archibald Garrot beschreef in 1902 de overerving van een zeldzame genetische ziekte bij de mens: Alkaptonurie. Dit is een ziekte met uiteenlopende symptomen, maar het meest opvallende is dat de urine van de patiënt zwart kleurt als het aan de lucht wordt blootgesteld. Het overervingspatroon in families met de ziekte Alkaptonurie viel Garrot op. Hij veronderstelde, in analogie met Mendel's werk, dat het hier om recessieve overerving gaat, waarbij beide ouders drager zijn van een erf-eigenschap of genetisch-defect. Ze uiten het kenmerk zelf niet, terwijl één of meer kinderen wel ziek is. Ongeveer een kwart van de kinderen heeft dan de ziekte. Gelukkig voor Garrot waren er in die tijd nog redelijk grote gezinnen.

In 1902 toonde hij aan dat in de urine van deze patiënten een te hoge concentratie homogentisinezuur aanwezig is. Hij veronderstelde dat het homogentisinezuur enzymatisch afgebroken zou moeten worden. Garrot stelde dan ook dat Alkaptonurie wordt veroorzaakt door een defect enzym. Hij beschreef dus een erfelijk veroorzaakte stofwisselingsziekte waarbij één defect gen-één defect enzym oplevert <sup>1</sup>.

U ziet dat het oog hebben voor één zeldzame patiënt met een opvallend kenmerk, zoals hier de zwartkleurende urine, kan leiden tot nieuwe inzichten. Die ene patiënt met een moeilijk te plaatsen klinisch beeld, blijkt soms van essentieel belang voor het verdere onderzoek.

Dit onderzoek was nog vóór het DNA bekend werd.

Het DNA, het deoxy-ribonucleïne zuur is, het belangrijkste molecuul van de 20<sup>e</sup> eeuw. Vanaf 1953 toen Watson en Crick de structuur van de hoog moleculaire stof hadden opgehelderd, werd het duidelijk dat dit molecuul daadwerkelijk de basis van de erfelijkheid vormt. Het draadvormige molecuul bestaat uit 2 complementaire streng en die ieder als mal voor een nieuwe streng kunnen dienen. Hierdoor is verdubbeling mogelijk en dus de celdeling te verklaren.

Wij zijn allemaal het product van onze biologische ouders. We dragen dan ook de genen, de erfelijke informatie verpakt in chromosomen, die we van onze moeder en vader hebben gekregen, van ieder precies de helft. Tijdens de bevruchting ontstaat een nieuwe cel, de zygote. De zygote deelt in twee dochtercellen. Ná de volgende deling zijn er vier cellen en na de 10de keer delen zijn er 1024 cellen. Deze cellen zijn inmiddels gehergroepeerd en er is een zg. een blastocyst ontstaan, met daarin een holte waarin ongeveer 8 cellen dé embryonale stamcellen vormen<sup>2</sup>. Deze embryonale stamcellen zullen uitgroeien tot het embryo. Na ongeveer 40-50 delingsrondes en na veel differentiatiestappen en specialisaties van celtypen wordt het nieuwe individu geboren.

Bekend is dat óp dit hele proces een strenge natuurlijke selectie wordt toegepast. Men schat nl. dat > 50% van de succesvolle bevruchtingen in een vroege miskraam eindigt. Van de levend geboren kinderen heeft ~ 3% toch nog een “ernstige” afwijking<sup>3</sup>. Deze afwijkingen zijn voor een deel te wijten aan chromosoomafwijkingen zoals bv. een extra chromosoom 21, het Down syndroom, welke in 1 op de 800 geboorten voorkomt. Andere oorzaken voor ernstige afwijkingen zijn monogenetische aandoeningen, ziekten veroorzaakt door één defect gen zoals bijv. CF de taaislijmziekte; multifactoriële aandoeningen zoals bv. een hazenlip, open rug, aangeboren hartdefect enz. Van de gezonde kinderen ontwikkelt ten minste 1 op de 5 later in het leven alsnog een aandoening die terug te voeren is op een of meer genetische defecten. In totaal zijn er ongeveer 5.000 erfelijke aandoeningen beschreven, slechts voor een kleine 1000 daarvan zijn ook de veroorzakende genen opgespoord.

Een gemiddeld persoon is opgebouwd uit  $10^{14} = 100$  miljoen maal miljoen cellen. Ieder van deze cellen bevat in principe hetzelfde DNA. Per cel is dat, als we alle chromosomen uittrekken en op een rij leggen, een DNA streng van een molecuul dik en ongeveer 2 meter lang die 6 miljard bouwstenen bevat.

Slechts 1 à 2% van ons DNA komt tot expressie, oftewel wordt ook daadwerkelijk als gen gebruikt en vertaald in een eiwit. Dat wil niet zeggen dat de overige 98% van het DNA niet belangrijk kan zijn. Dit niet-coderende en meestal repetitieve DNA zit tussen en ook in de genen.

Dit niet-coderende DNA speelt vaak een belangrijke rol bij de timing van de gen-expressie en voor de weefsel-specificiteit van de genexpressie.

Het afgelopen jaar stond het Humane Genoom Programma volop in de schijnwerpers. De genenkaart van de mens is nagenoeg af. Het resultaat schokte zelfs de meest vooraanstaande wetenschappers, want de mens heeft geen 80.000 genen zoals jaren werd gedacht maar slechts 32.000 genen. Dit is maar 2 maal zoveel als het kleine fruitvliegje heeft<sup>4</sup>.

Het lijkt erop dat wij de genen die we hebben, efficiënt gebruiken door ze in verschillende weefsels en op verschillende tijdstippen in de ontwikkeling te gebruiken. Er zijn per gen meerdere startsignalen. Elk startsignaal is specifiek voor genexpressie in een bepaald weefsel. Daarnaast is er ook soms sprake van zg. alternatieve splicing waarbij stukken van het gen (exonen) wel of niet worden gebruikt. Een gencode kan dus wel 5 à 10 verschillende eiwitten opleveren<sup>5</sup>.

#### Variatie in het DNA

Ieder van ons hier in de zaal is genetisch verschillend. Het DNA van één persoon is in principe in alle cellen gelijk en uniek voor die ene persoon.

Tussen 2 willekeurige personen is de overeenkomst in de DNA-volgorde hoog nl. >99,99%. De verschillen zijn echter numeriek toch talrijk, ieder van u hier in de zaal verschilt van uw buurman of buurvrouw op tenminste 600.000 plaatsen in uw DNA. Want 1/100<sup>ste</sup> procent verschil in 6 miljard base paren is nog altijd ongeveer 600.000 verschillen.

Dit is zo talrijk dat DNA makkelijk als een persoonlijk identificatiemiddel te gebruiken is. Justitie maakt dankbaar gebruik van deze informatie bij het oplossen van misdrijven. Sinds 1994 is er een officieel contra-expertise laboratorium voor forensisch DNA onderzoek bij ons ondergebracht. Met het in huis halen van het forensisch onderzoek hebben wij ons ook verplicht volgens strikte kwaliteitsnormen te werken (volgens ISO 17025 RvA, voorheen Sterlab)<sup>6</sup>.

Regelmatig wordt met het forensisch onderzoek het nieuws gehaald: vooral bij oude strafzaken en onopgeloste moorden kan DNA uitstekend als redmiddel dienen.

De grote onderlinge variatie in het menselijk DNA wordt door onderzoekers ook gebruikt als hulpmiddel bij populatieonderzoek naar onze afstamming. Het DNA bevat als het ware een historisch archief van wat er gedurende de evolutie veranderd is<sup>7</sup>. Hoe interessant dit ook allemaal is, vanmiddag zal ik daar niet verder op ingaan. Ik zal mij bij de klinische toepassingen van het DNA-werk houden.

De eerste DNA-test voor een genetisch defect werd in 1978 door Kan en Dozy beschreven<sup>8</sup>. Het ging om een enkele base verandering in het Beta-globine gen, die de ziekte sikkelcelanemie veroorzaakt.

In ons laboratorium in 1979, toen o.l.v. professor Peter Pearson, werd begonnen aan het opsporen van willekeurige verschillen in het DNA. Deze vaste herkenningpunten

in het DNA, DNA-markers genoemd, zouden gebruikt worden om de overerving van erfelijke eigenschappen in families te volgen en daar een voorspelling mee te doen. In 1981 hadden we een eerste set van die DNA-markers in handen<sup>9</sup>. Elk van de DNA markers had een eigen unieke plaats op de genetische kaart.

Eén van die eerste DNA-markers op het X-chromosoom lag redelijk dicht bij het Duchenne spierdystrofie gengebied. Duchenne spierdystrofie is een ernstige aandoening die vooral bij jongens voorkomt en progressief verloopt<sup>10</sup>. De ziekte is niet direct zichtbaar. Het zijn vaak de ouders die als eerste merken dat er iets mis moet zijn. Het jongetje loopt pas na de 18<sup>de</sup> maand, valt veel en heeft moeite met opstaan. Rond het 4<sup>de</sup> levensjaar komt meestal na aandringen van de ouders de kinderarts er aan te pas. Rond het 10<sup>de</sup> jaar zal het patiëntje rolstoel afhankelijk worden. Bij ongeveer 20 tot 30 % van de Duchenne patiënten is er een achterstand in de verstandelijke ontwikkeling. De gemiddelde levensverwachting van een Duchenne patient is ongeveer 20-25 jaar. Na een voordracht over de nieuwe mogelijkheden met DNA-technieken, kwam Pearson in gesprek met IJsbrand Poortman, directeur van de Vereniging Spierziekten Nederland. Poortman wist Pearson te overtuigen om aan de spierziekte van Duchenne te gaan werken. Hoewel dit de meest voorkomende erfelijke spierziekte bij jongens is, gaat het hier toch ook om een zeldzame aandoening. Jaarlijks worden in Nederland ongeveer 30 jongens met deze spierziekte geboren. Moeders en andere vrouwelijke familieleden hebben een hoog risico om draagster van deze ziekte te zijn. Veel echtparen in deze families besloten dan ook om af te zien van kinderen. Sommige echtparen kozen er voor om via prenatale diagnostiek alleen dochters geboren te laten worden. Sinds eind jaren zestig was het mogelijk geworden om via vruchtwater onderzoek, in de 15<sup>e</sup>-17<sup>e</sup> week van de zwangerschap, m.b.v. chromosoomanalyse het geslacht te bepalen. In geval van een mannelijke foetus werd de zwangerschap dan beëindigd. Dit desondanks de wetenschap dat de helft van de geaborteerde mannelijke foetussen gezond zouden zijn. Dit was de reden waarom Poortman er bij Pearson op aandrong om prenatale DNA-diagnostiek voor Duchenne spierdystrofie op te zetten.

Eind 1983 konden we al in een aantal families draagsterschaponderzoek doen en een aantal vrouwen gerust stellen dat ze géén risico op een zoon met DMD hadden<sup>11,12</sup>. Eind 1984 werd de eerste prenatale DNA-test voor deze ziekte uitgevoerd in samenwerking met o.a. Rotterdam en Groningen<sup>13</sup>. Dit was de eerste prenatale diagnose voor Duchenne in de wereld. In de 11<sup>e</sup> week van de zwangerschap werd m.b.v. de vlokcentest zowel naar de chromosomen voor het geslacht als naar het DNA voor de spierziekte gekeken. De eersten, van de vele, gezonde zonen die werden geboren na tussenkomst van een DNA-test, zijn nu nog geen 20 jaar. Dit geeft nogmaals aan hoe jong dit vakgebied eigenlijk is.

De DNA-diagnostiek groeide, niet alleen voor de ziekte van Duchenne maar ook voor

Hemofilie en voor de ziekte van Huntington kwamen er vragen uit families. Even was er discussie of die diagnostiek niet in “routine laboratoria” thuishoorde. Men kwam echter tot de conclusie dat we deze speciale diagnostiek op hoogwetenschappelijk niveau moeten blijven aanbieden. De reden hiervoor is dat er vanuit het fundamentele onderzoek naar de ziektegenen regelmatig nieuwe inzichten en ook nieuwe diagnostische tests ontwikkeld worden, die dan snel in de patiëntenzorg geïntroduceerd kunnen worden. Bovendien zou die ene zeldzame moeilijk te verklaren patiënt direct bij kunnen dragen aan het wetenschappelijk onderzoek.

Met behulp van een Preventiefondssubsidie werd door professor van Ommen onderzoek gedaan naar de opheldering van het Duchenne gen. Er werden grote stukken DNA gekloneerd en met speciale analysetechnieken onderzocht. In 1986 werd het Duchenne gen door de Amerikaanse groep van Lou Kunkel gekloneerd<sup>14</sup>. Het bleek te coderen voor een relatief groot staafvormig eiwit, dystrofine gedoopt, dat net onder het spiermembraam verankerd ligt en daar voor stevigheid en flexibiliteit zorgt. Bij Duchenne patiënten is er nauwelijks of geen dystrofine in de spiercellen aanwezig. Op DNA-niveau is het gen enorm groot. Van Ommen was in 1986 de eerste die kon aantonen dat het dystrofinegen meer dan 2 miljoen baseparen lang moest zijn. Dit aan de hand van een Duchenne patiënt uit de 66ste familie die onderzocht werd en waarbij een afwijkend DNA-patroon werd gezien. Met 2,4 miljoen basenparen is het dystrofinegen tot op heden nog steeds het grootste gen<sup>15</sup>.

Inmiddels was ook bekend dat 65% van de Duchenne patiënten een deel van hun DMD gen missen. Middels een DNA-test kunnen we bij hen een deletie aantonen van een aantal exonen<sup>16</sup>. Bij ongeveer één derde van de patiënten blijkt de deletie nieuw te zijn. De moeder mist het stuk DNA niet in haar somatische cellen (bloed), dus is er sprake van een nieuw ontstane mutatie. We bewezen dit ook nog met het feit dat een gezond broertje hetzelfde maternale X chromosoom draagt. Moeder heeft géén risico op nog een zoon met DMD, dachten we toen<sup>17</sup>.

Niet lang daarna belde professor Christine van Broeckhoven uit Antwerpen mij met een soortgelijke Duchenne familie: de moeder had geen deletie, terwijl haar zoon met Duchenne die wel had; er was geen gezond broertje met hetzelfde X chromosoom. De moeder was nu 12 weken zwanger en de vraag was: Moet er nu wél of géén prenatale test aangeboden worden?

De moeder wilde absoluut niet nog een kind met de ziekte. Hoewel Christine en ik er bijna zeker van waren dat moeder geen draagster was, hebben we toch het zekere voor het onzekere genomen en besloten we om de foetus te testen. Het bleek een mannelijke foetus met exact dezelfde deletie, en dus aangedaan met de spierziekte van Duchenne. De ouders besloten de zwangerschap af te breken. Verder onderzoek wees uit dat de moeder in haar bloed (somatisch) de deletie niet droeg. Toch had zij tweemaal een eikel met de mutatie doorgegeven. Zij was dus mozaïek in haar geslachtscel-

len, kiemcelmozaïek voor deze nieuw ontstane deletie<sup>18</sup>. Later werd in meer families bewezen dat kiemcel- en of somatisch-mozaïek relatief veel voorkomt. Uit empirische gegevens, waaronder inmiddels 6 Duchenne families met bewezen kiemcel mozaïek, stelden we in 1989 vast dat er 14% kans is dat hetzelfde X chromosoom weer met een deletie wordt doorgegeven<sup>19</sup>.

Voordat ik verder ga met andere diagnostische voorbeelden zal ik eerst kort in gaan op de ontwikkeling van de DNA-diagnostiek in Nederland.

Erfelijkheidsadvies en erfelijkheidsdiagnostiek startte in 7 centra voor Klinische Genetica. Eind jaren 70, begin jaren 80 werden deze centra geformeerd. Ieder klinisch genetisch centrum als een Stichting met aparte financiering, verbonden aan het lokale Academisch Ziekenhuis.

In 1988 kwam de eerste officiële vergoeding voor DNA-diagnostiek. Na onderhandelingen van professor Hans Galjaard met de ziekenfondsraad kwam er een AWBZ-subsidie voor DNA-diagnostiek. In 4 van de 7 centra n.l. Leiden, Groningen, Nijmegen en Rotterdam werd gestart omdat in deze 4 centra inmiddels voldoende expertise en volume aan diagnostiek opgebouwd was. Ruim tevoren, sinds 1986, was er op initiatief van Pearson onderling overleg geweest waarbij de laboratoria afspraken maakten wie welke diagnostiek zou kunnen en gaan aanbieden. Deze verdeling is gebaseerd op aan de ene kant de research-achtergrond en de specifieke diagnostische expertise voor het ziektebeeld en aan de andere kant de frequentie van de aandoening in de bevolking. Na vier jaar, in 1992, was er een evaluatie en werd er een kosten-baten analyse gestart<sup>20</sup>. Op basis daarvan werd in 1996 een ziektekostentarifief voor DNA-diagnostiek ingevoerd. En nu voor alle klinisch genetische centra.

De onderlinge afspraken tussen de laboratoria werden ook na invoering van het DNA-tarief vastgehouden en uitgebreid over de andere laboratoria. Er ontstond een Landelijk Overleg DNA-diagnostiek, waarin de betrokken laboratoria, nu 9 (alle Academische centra plus het NKI) nog steeds participeren en afspraken maken over de aan te bieden diagnostiek, uitslagtermijnen, kwaliteitsnormen enz. En daarmee was een nieuw vakgebied ontstaan.

Zoals de wetenschaps-technoloog Annemiek Nelis in haar proefschrift in 1998 al beschreef, zal de DNA-diagnostiek blijvend zijn<sup>21</sup>. Met de groeiende informatie uit het genoomproject zal de DNA-diagnostiek deels uit de klinische genetica groeien en een sleutelrol krijgen bij het diagnostisch vaststellen van genetische aandoeningen bij patiënten. De nadruk zal hierbij liggen op de bevestigende diagnostiek, ten behoeve van de behandeling, het inschatten van de prognose van de ziekte en de keuze van therapie.

Zo wordt jaarlijks bij gemiddeld 10.000 personen in Nederland de diagnose darmkan-



ker gesteld. Bij 10-30 % van deze personen lijkt erfelijkheid een rol te spelen want darmkanker komt in de familie vaker voor. Afhankelijk of er poliepen in de darmen geconstateerd worden, wordt er aan FAP=Familiäre Adenomateuze Poliposiscoli of aan HNPCC=Hereditaire Non Poliposis Colon Cancer gedacht. Voor beide erfelijke aandoeningen werd in samenwerking met de STOET<sup>22</sup> olv van wijlen professor Meera Khan, professor Ricardo Fodde en door dr Juul Wijnen zeer succesvol onderzoek gedaan<sup>23</sup>.

Bij FAP patiënten worden honderden zonet duizenden goedaardige gezwelletjes, poliepen, in de darm aangetroffen. Ruim voor het 40<sup>ste</sup> jaar zullen enkele hiervan kwaadaardig ontaard zijn en een tumor vormen. In 1996 werd het APC-gen, verantwoordelijk voor FAP, gekloneerd en werden de eerste mutaties in het APC-gen aangetoond. In families waarin een mutatie gevonden is wordt meestal op relatief jonge leeftijd (vanaf 10 jaar) presymptomatisch onderzoek aangeboden. Omdat FAP op jonge leeftijd al tumoren kan geven, is een tweejaarlijks colonoscopie onderzoek bij risico dragers nodig. Na een presymptomatische DNA-test kan voor de helft van deze patiënten dit niet zo prettige darmonderzoek gestaakt worden. Voor de personen die wel drager blijken te zijn, kan een frequenter darmonderzoek of eventueel een vroegtijdige verwijdering van de dikke darm overwogen worden. Deze ingrijpende operatie verlengt de levensduur aanzienlijk<sup>24</sup>. De diagnostiek voor FAP wordt uitsluitend in Leiden uitgevoerd. Het gaat bij FAP om ongeveer 180 patiënten voor een DNA test per jaar.

Als een bepaalde verandering of mutatie in alle cellen van het lichaam aanwezig is dan spreken we van een kiembaanmutatie, want de mutatie was dan meestal bij één van de ouders in de geslachtscellen aanwezig. Deze verandering is dus erfelijk.

Het DNA onderzoek bij sporadische poliposis patiënten heeft ook aangetoond dat ten minste 10 à 15 procent van de patiënten een nieuw ontstane mutatie draagt. Geen van de ouders heeft symptomen van de ziekte, zij hebben ook geen aantoonbare mutatie in hun DNA geïsoleerd uit bloed. Analooq aan mijn eerdere uitleg bij moeders van nieuwe Duchenne patiënten, is er ook hier een risico dat één van de ouders drager van een kiemcel-mozaïek is.

Bij een aantal Poliposis patiënten, toonden we in 10-20% van hun bloedcellen een mutatie aan. Zo'n patiënt is dan een somatisch mozaïek. In deze situatie hebben zijn of haar broers en zussen géén verhoogd risico op FAP. De patiënt zou ook wel een laag percentage kiemcelmozaïek kunnen hebben en de mutatie later volledig aan zijn of haar nageslacht door kunnen geven.

Kortom, we hebben gevoeliger methoden nodig om mutaties die als laag somatisch mozaïek voorkomen, op te kunnen sporen.

We gaan in de nabije toekomst hier verder onderzoek naar doen.

Op zich is het ontstaan van mutaties een heel normaal verschijnsel en vaak zijn ze onschuldig. Ieder van ons heeft 50-100 gemuteerde genen van de circa 32.000 genen die in iedere cel aanwezig zijn. Ongeveer 15-30 van deze gemuteerde genen hebben we van vader of moeder gekregen. De overige defecte genen zijn nieuw; 35-70 overige mutaties zijn nieuw tijdens ons leven na de zygote vorming ontstaan. Uit studies met muizen is gebleken dat de nieuwe geslachtscellen al heel vroeg, een paar delingen na de vorming van de embryonale stamcellen, apart gezet worden<sup>2</sup>. Als een mutatie is opgetreden in het embryo voordat de nieuwe geslachtscellen aangelegd zijn, dan ontstaat een gecombineerde mozaïek, zowel somatisch als kiemcel. Zoals ik zojuist zei hebben we voor de volgende aandoeningen Duchenne spierdystrofie, hemofilie A, polyposis coli, en FSHD dit soort gecombineerde mozaïeken gezien. Het is duidelijk, dat gendefecten, frequent nieuw ontstaan. Voor meer dan 50 ziektegenen is nu uit literatuur bekend dat nieuwe mutaties zowel als kiemcelmozaïek als somatisch mozaïek tegelijk voorkomen en dat de mutaties dus vroeg in de embryogenese zijn ontstaan<sup>25</sup>. Dit betekent dat meeste zg. “nieuwe” mutanten dus al 20-60 jaar oud zijn want ze ontstonden in een van de ouders of grootouders toen die **nog embryo** waren!

Dit is heel opmerkelijk, zo ook het feit dat mutaties niet altijd willekeurig lijken te ontstaan. Er zijn talloze voorbeelden van zg. Recurrent, of herhalende mutaties, onafhankelijk van elkaar opgetreden op precies dezelfde plek in het DNA<sup>26</sup>. Waarom is niet bekend, maar ik denk dat het met de omliggende basevolgorden of met gebieden in het DNA te maken heeft welke tegelijk tot expressie komen. Nu de basevolgorde van het DNA bijna geheel bekend is en we inzicht krijgen in wanneer welke genen actief zijn, is er dringend fundamenteel onderzoek nodig naar het ontstaan van deze zich steeds opnieuw herhalende fouten in het DNA. Want zoals ik zei, denk ik dat deze fouten soms door het DNA of RNA zelf bevorderd worden<sup>27</sup>. Dat zou kunnen betekenen dat de evolutie zich niet altijd willekeurig voltrekt maar voor een klein deel al vastligt.

Niet alleen is meer fundamenteel wetenschappelijk onderzoek nodig, maar ook moet er aandacht zijn voor de verfijning en van de bewaking van de kwaliteit van de diagnostiek.

Zoals ik al eerder zei was er bij ons in Leiden ervaring opgedaan met het opzetten van een kwaliteitssysteem voor het forensisch laboratorium in 1994. Deze ervaring kwam goed van pas om ook het DNA-diagnostiek laboratorium geaccrediteerd te krijgen. In 1998 werd het Leidse DNA diagnostiek-laboratorium als eerste van deze laboratoria in Nederland officieel door de RvA geaccrediteerd. Het NKI in Amsterdam volgde afgelopen najaar ons voorbeeld. De overige 7 klinisch genetische laboratoria zijn druk bezig om ook de gewenste accreditatie te halen.

Gezamenlijk hebben de 9 Nederlandse laboratoria zich in 1996 aangesloten bij de Engelse en Ierse laboratoria om mee te doen aan externe kwaliteitscontroles. Dit zijn

ringstudies waarin de werking van het eigen laboratorium getoetst wordt. Leren van je fouten en leren van elkaar. Het continue verbeteren. Dit is een essentieel onderdeel van het kwaliteits systeem.

Via een Europese subsidie loopt er een soortgelijk project (EMQN)<sup>28</sup>. Wij organiseren daarin zelf de rondzendingen van monsters voor de ziekte van Huntington en Duchenne spierdystrofie. De uitkomsten van deze ringstudies zijn zowel schokkend en leerzaam. Ze tonen aan dat er relatief veel fouten (1,3%- 5% misdiagnosen) worden gemaakt, ook door gerenommeerde laboratoria<sup>29</sup>. Dit geeft aan dat voor een diagnostisch DNA laboratorium borging van testen met zowel interne als externe controles een must is.

Het totale pakket aan aandoeningen, waarvoor DNA-diagnostiek in Nederland wordt aangeboden, beslaat inmiddels meer dan 250 verschillende ziekte – gen combinaties. Voor 75% hiervan, 188 ziekten, geldt dat ze slechts in één van de Nederlandse laboratoria wordt uitgevoerd<sup>30</sup>. De overige meestal frequent voorkomende aandoeningen zoals erfelijk borst- en ovarium kanker, erfelijke darmkanker en X-gebonden mentale retardatie of Fragiele X-syndroom worden op meerdere plaatsen gediagnostiseerd. Echter hier geldt wel een regel dat het onderzoek van één familie beperkt blijft tot één laboratorium, zodat de diagnostiek per stamboom uniform verloopt. De totale omvang aan diagnostiek was in 2001 >20.000 postnatale DNA onderzoeken en >300 prenatale DNA-onderzoeken. Wij hebben in Nederland een aparte situatie want zo strak georganiseerd is DNA-diagnostiek nergens.

De huidige situatie van de DNA- diagnostiek in Nederland is uniek en kostenefficiënt, maar ook kwetsbaar. Met de geleidelijke integratie van de Klinisch Genetica in de UMC 's bestaat het gevaar dat de landelijke samenwerking onder druk zal komen te staan. Onderzoeksprioriteiten, zwaartepunten in eigen Huis kunnen anders liggen. In overleg moet daar uit te komen zijn.

Ik begrijp deze ontwikkeling en vind ook dat we als klinisch moleculair genetici en zeker in het eigen UMC een taak hebben om onze landelijke verdeelfilosofie te verdedigen. Wij kunnen als tussenpersoon optreden en er voor staan dat de diagnostiek van zeldzame erfelijke aandoeningen (waarvoor bijvoorbeeld minder dan 200 testen per jaar gedaan worden) snel en zo efficiënt mogelijk wordt uitgevoerd. Sommige aandoeningen zijn echter zo zeldzaam dat er een buitenlands laboratorium gezocht zal moeten worden waar de test wel operationeel is.

Wat betreft de bevestigende diagnostiek voor frequente erfelijke ziekten of genetische testen voor risicofactoren is het duidelijk dat deze op termijn decentraal in regionale centra uitgevoerd zullen gaan worden. Zeker als, zoals verwacht wordt voor enkele aandoeningen in de loop van de komende 10-20 jaar therapie mogelijk wordt, dan stijgt de diagnostiekvraag enorm.

Het verdient de voorkeur dat de genetische diagnostiek voor erfelijke aandoeningen goed blijft ingebed in een overlegstructuur waarbij kwaliteitseisen voor de uitvoeren-

de labs en genetische implicaties voor de patiënten besproken worden, zodat de interpretatie van de uitslagen de nodige aandacht blijft krijgen. Al in 1998 werd in het rapport DNA-diagnostiek van de Gezondheidsraad deze ontwikkeling in het vooruitzicht gesteld<sup>31</sup>. Het zou goed zijn als er vanuit het vakgebied in nauw overleg met de klinisch chemici rond 2005 een nieuw uitgewerkt plan ligt waarin het duidelijk wordt onder welke voorwaarden bijvoorbeeld een groot regionaal ziekenhuis een pakket van diagnostische genetische testen op individuele patiënten kan en mag uitvoeren.

Ingeval van aandoeningen waarbij familie-onderzoek, presymptomatisch- of prena-taal-onderzoek moet geschieden, zal altijd vooraf overleg moeten zijn met een klinisch geneticus of genetic associate voor adequaat erfelijkheids-advies en eventueel psychosociale begeleiding. Dit type DNA-onderzoek zal dan ook in de bestaande laboratoria van de klinische genetica gedaan blijven worden, omdat deze laboratoria de onderzoek-resultaten per familie archiveren en ze volgens het huidige privacy reglement over meerdere generaties zullen bewaren.

De groei van de diagnostiek, alleen al meer dan 30% in het afgelopen jaar, brengt met zich mee dat automatisering en convergentie naar standaard technieken zoals de DNA-sequencing nodig is. De technische ontwikkeling gaat zo snel dat de kostbare apparatuur relatief snel veroudert. Robots en DNA sequencers en andere computerge-stuurde apparatuur zouden een standaard afschrijvingstermijn van 5 jaar in plaats van de 10 jaar moeten hebben.

De snelle ontwikkeling in de genetica, meer genen te testen, de eis van snellere uitslagtermijnen, kortom de toenemende werkdruk veroorzaakt regelmatig rode hoofden bij de analisten op het lab en bij de stafleden aan de telefoon. Daarbovenop komt het bijhouden van het kwaliteitssysteem, dat op dit moment enorm veel tijd kost en veel efficiënter zou kunnen. Voor het goed bijhouden van de honderden documenten is een geautomatiseerd document beheer-systeem noodzakelijk welke liefst LUMC breed gedragen wordt. Echter wie durft er te beslissen welk systeem het moet worden?

De meeste van onze aanvragen voor DNA-onderzoek, zo'n 65%, komen van buiten de eigen regio. Van binnen de eigen regio zijn het voornamelijk aanvragen voor borst- en darmkankeronderzoek. In 2001 werden ook voor een flink aantal aandoeningen, monsters uit het buitenland onderzocht. De klinische genetica in Leiden ontpopt zich steeds meer als Superregionaal, Europees of zelfs wereldwijd expertise centrum voor DNA-diagnostiek van erfelijk bepaalde aandoeningen. Logischerwijs zijn deze aandoeningen ook terug te vinden in het profiel van het LUMC, zoals bijvoorbeeld de Oncogenetica, met borstkanker, darmkanker, melanoma, kraakbeentumoren, tumoren van het hoofd-halsgebied, de Neurogenetica met de spierziekten zoals Duchenne, Becker, Limb Girdle MD, FSHD, Kanalopathiën, en met ziekten zoals Huntington, CADASIL, Migraine en erfelijke hersenbloedingen.

Eenzelfde verhaal geldt natuurlijk ook voor de andere Nederlandse centra die ieder weer hun eigen pakket van aandoeningen verzorgen.

Op 10 jan 2001 werd door het Europese Patent Bureau het eerste patent voor de erfelijke borstkanker testen van de firma Myriad Genetics goedgekeurd<sup>32</sup>. In Amerika heeft Myriad Genetics eerder al het exclusieve recht opgeëist om middels sequentie analyse mutaties op te sporen bij borstkanker patiënten. De test voor de 2 genen is à 2680 \$ per patiënt. Daarnaast geeft zij niet-exclusieve licenties uit voor een test met daarin een beperkte set van al bekende mutaties en vraagt 45\$ per uitgevoerde pre-symptomatische test.

In Europa heeft Myriad Genetics aangekondigd op termijn eenzelfde licentiesysteem te willen introduceren. Daar zijn wij het niet mee eens.

De gezamenlijke Nederlandse DNA-diagnostische Labs o.a.v. mevr. dr. Dicky Halley, voorzitter van het landelijkoverleg DNA-diagnostiek, en de Belgische laboratoria o.l.v. dr. Gert Matthijs vechten de toekenning van de patenten in Europa aan. Ook in andere landen zijn acties tegen het borstkanker patent op gang gekomen. Op een aantal punten, waaronder de bestaande voorkennis ten tijde van de indiening van het patent en de originaliteit van het beschikbaar worden van de gensequentie, wordt het patent aangevochten. Want al in 1994, nog voor het bekend zijn van het BRCA1gen zelf, werd en er in ons laboratorium i.s.m. dr. Peter Devilee, betrouwbare presymptomatische draagsterschapstesten uitgevoerd m.b.v. DNA-markers<sup>33</sup>. Mocht Myriad Genetics toch gelijk krijgen dan zullen wij via de rechter een dwanglicentie proberen te krijgen om de diagnostiek in Nederland tegen een redelijke prijs en met hoge kwaliteit te kunnen blijven uitvoeren.

### Toekomst in de gezondheidszorg

Het zo juist in kaart gebrachte Menselijke Genoom zal gedurende het eerste decennium van de 21<sup>e</sup> eeuw heel wat wetenschappers bezig kunnen houden want, zoals ik eerder zei kennen we de genenkaart en weten nu wel waar de genen liggen, maar slechts van een paar 1000 kennen we ook de echte functie. Verkenning naar de expressie, de genproducten, ook wel proteomics genoemd, is een uitdaging die waarschijnlijk omvangrijker zal zijn dan het HGP. De verkregen proteomicsinformatie zal niet alleen gegevens over de plaats, de tijd en de hoeveelheid van het genproduct opleveren. Het geeft inzicht in de werking van het eiwit, leert ons over de interacties die het eiwit aan kan gaan met andere eiwitten. Tevens krijgen we inzicht in het hoe, waar en wanneer het eiwit wordt afgebroken. Dit laatste is een belangrijk punt want de ook de eiwitafbraak is een belangrijk regelmechanisme in de cel. Teveel van een eiwit is vaak net zo slecht als te weinig. Foutieve genproducten en ongewenste ophopingen kunnen leiden tot functieverstoringen of tot celdood. Zoals bijv. het Beta-amyloid eiwit dat bij de ziekte van Alzheimer in de hersenen ophoopt en dementie veroorzaakt. Pas als we de route weten hoe de ophopingen ontstaan, en tegen te gaan zijn, of hoe ze teniet

gedaan kunnen worden als ze eenmaal zijn ontstaan, pas dan is er ook zicht op preventie of genezing.

Zonder hoop is er geen toekomst, maar we moeten wel reëel blijven en ik wil geen valse hoop wekken. Voor de meeste monogene aandoeningen zal het nog minstens 10 of 20 jaar duren voordat er een therapie is, als die er al komt.

Bijvoorbeeld nu, 24 jaar na de eerste DNA-test voor een enkele base verandering in het Beta-globine gen voor ziekte sikkelcelanemie, is er ondanks vele pogingen wereldwijd nog geen effectieve (gen)therapie voor deze aandoening. In Afrika en rond de Middellandse zee komen Beta-globine afwijkingen als ernstige ziekten zeer frequent voor, wel tot 1 op de 200 pasgeboren kinderen. Prenatale diagnostiek is de enige optie en heeft o.a. in Italië tot sterke reductie van het aantal kinderen met Beta-Thalassemia geleid<sup>34</sup>.

Variaties in het DNA zijn niet altijd zo onschuldig als tot voor kort werd gedacht. Bijvoorbeeld de gevoeligheid of juist de ongevoeligheid voor bepaalde medicijnen wordt vaak beïnvloed door verschillen in expressie-niveaus van metaboliserende enzymen. Een schijnbaar onschuldige DNA variant (een A i.p.v. een G) in een start-sigitaal van een enzymgen kan hierbij een rol spelen. Dit bevestigt nogmaals dat niet ieder persoon even goed zal reageren op de hem toegediende medicijnen. Er zou dus eigenlijk een test vooraf moeten zijn om te bepalen of dat ene bepaalde bloeddrukverlagende middel voor de patiënt in kwestie wel effectief is. De grote farmaceutische industrieën zijn hier op gedoken en zoeken naar veranderingen in het menselijke DNA, die effectiviteit van de medicijnen kunnen voorspellen. Dit wordt ook wel de farmacogenomics genoemd. Binnenkort zullen de eerste “geneesmiddelen-op-maat” op de markt komen. Snelle genetische tests, betreffende honderden van deze variaties, zogenaamde SNP's, single nucleotide polymorfismen, zullen dan het voorschrijven van medicijnen vooraf gaan. De Gezondheidszorg verschuift in de komende 20 jaar steeds meer van behandeling in de richting van preventie, dus minder ingrepen en meer testen gevolgd door afgestemde medicatie.

Terugblikkend blijkt dat het 1983 genomen besluit om de DNA-diagnostiek niet los te koppelen van het fundamentele onderzoek een zeer goede beslissing is geweest. Ook in de toekomst zal deze unieke koppeling tussen het wetenschappelijk onderzoek en de klinische toepassingen zoals de DNA-diagnostiek en later eventueel therapie nodig blijven. Zodat de nieuwe inzichten en ook nieuwe diagnostische tests die ontwikkeld worden, snel in de patiëntenzorg geïntroduceerd kunnen blijven worden.

Meneer de Rector magnificus,  
Geachte aanwezigen,

Aan het einde van mijn oratie gekomen wil ik graag enkele woorden van dank uitspreken. Ik ben mij er van bewust dat het onmogelijk is om iedereen die enigerlei heeft bijgedragen hier persoonlijk te bedanken. Dus ook voor iedereen die ik hier niet bij naam noem, bij deze hartelijk dank voor de samenwerking, het vertrouwen, de steun en de inzet.

Dames en heren bestuurders van de Universiteit, het LUMC, en het KGCL.  
Ik dank u allen voor het in mij gestelde vertrouwen en voor deze benoeming. Ik waardeer het nog altijd zeer om in zo'n actueel vakgebied als de Genetica en in zo'n stimulerende omgeving als het LUMC te mogen werken.

Hooggeleerde Pearson, Beste Peter,  
Ik vind het erg jammer dat juist jij er vandaag, wegens andere verplichtingen, niet bij kunt zijn. Mijn wetenschappelijke vorming en carrière in de humane genetica heb ik voor een groot deel aan jou te danken. Altijd direct het diepe in. Eén van de eerste tests: We hadden een stukje van de genetische kaart rond het HLA-gebied op chromosoom 6 opgehelderd. Jij had een afspraak gemaakt bij Prof. van Rood om onze resultaten daar op hun werkbespreking te presenteren. Terwijl je je jas al aan had vroeg je of ik ook mee ging, onderweg gaf je mij je dia's en zei: "ach vertel het zelf maar jij weet wat je gedaan hebt". Hieruit ontstond mijn eerste wetenschappelijke artikel in 1979<sup>35</sup>. De uitdagingen die jij mij voorzette waren allemaal hun tijd ver vooruit, ik surfte op de voorste golf van het DNA-onderzoek. Jouw enthousiasme, het vertrouwen en de vrijheid die jij mij gaf heb ik altijd zeer gewaardeerd. Ook dank ik je voor het feit dat je er op stond dat ik voor je vertrek naar Baltimore mijn proefschrift zou afronden en verdedigen eind 1989. Zodat ik bij jouw vertrek in 1990 zelf de DNA-diagnostiek kon gaan leiden.

Hooggeleerde van Ommen, Beste Gert Jan, van oorsprong was Peter Pearson een cytogeneticus en geen moleculair bioloog, dat was jij wel. Van jou heb ik dan ook heel veel geleerd. Ook dank ik je, voor je wetenschappelijke discussies en voor de vrijheid en steun waar nodig die je mij de afgelopen jaren hebt gegeven om met de Humane Genetica, nu onder jouw leiding, door te groeien.

Hooggeleerde Breuning, beste Martijn,  
Eerst als collega en later als hoofd van de Klinische Genetica, heb ik jouw belangstelling, en medeleven in de DNA-diagnostiek zeer op prijs gesteld. Ik waardeer het feit dat je mij al de klinisch genetische laboratoria hebt toevertrouwd, onder gebracht in de subafdeling Klinisch Genetische Laboratorium-diagnostiek. Ik wacht met smart op

een uni-locatie in het nieuwe O&O gebouw want pas dan kan er sprake van een nieuwe eenheid zijn.

Collega's van de DNA-diagnostiek,

Het opbouwen en in stand houden van een diagnostisch laboratorium gaat niet alleen, daarvoor heb je meerdere gedreven mensen nodig met hart voor de diagnostiek, oog voor kwaliteit, betrokkenheid en een eigen verantwoordelijkheid zoals de klinisch moleculair genetici: Monique Losekoot, Ieke Ginjaar en Carli Tops ieder met hun eigen diagnostische aandachtsgebied. Sander Kneppers, Hoofdanalist en spil van onze organisatie, Els Voorhoeve Kwaliteitsmanager als ons geweten, en Annemieke Neary op het secretariaat als regelcentrum. Verder dank ik Michiel, Dennis, Ellen en verder alle analisten en medewerkers van nu maar ook van vroeger.

Collega's van het forensisch lab. Ik ben vol waardering voor de wijze waarop jullie de laatste paar jaar steeds zelfstandiger het laboratorium draaien en de meest bizarre zaken dmv DNA onderzoek weten op te lossen. Peter de Knijff, Patrick Dieltjes, Rene Mieremet, en de rest van de Crew: Bedankt en ga zo door.

Medewerkers van het Cytogenetisch laboratorium, sinds het begin van de klinische genetica is de cytogenetica een van de grootste pijlers waar het KGCL op steunt, dit is nooit voldoende gewaardeerd. Ook de cytogenetica in Leiden is het eerste en enige in zijn soort met een kwaliteitscertificaat, iets om trots op te zijn. De snelle ontwikkelingen in de genetica zullen beslist ook veranderingen geven voor de toekomst van de cytogenetica maar het feit blijft dat de Chromosomen altijd geanalyseerd zullen blijven worden.

Van al diegenen aan wie ik veel te danken heb, nemen Hanny, Sander en Suzanne, een speciale plaats in. Zij hebben mij de ruimte gelaten zodat dit vandaag tot stand kon komen. Lieve Hanny, bedankt dat je me de kans heb gegeven om me geheel op mijn werk de genetica te storten. Ik waardeer het enorm, dat je mij al ruim 25 jaar hebt willen delen met die ander genaamd Het LAB.

Ik heb gezegd.



## Literatuur

1. De termen gen en enzym waren in de tijd van Garrot's eerste bevindingen niet bekend. Hij gebruikte dan ook bewoordingen als erfelijkheidsfactor en vergisting in zijn originele publicatie in 1902, Garrot, E. A. The incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality. *Lancet* 2 :1616-20. Zie ook Garrot, A.E. (1909: reprinted 1963). Inborn errors of metabolism. Oxford University Press, London.
2. Na de zygote vorming is na een aantal celdelingen een zg. morula, een klompje van 16 identieke cellen, ontstaan. Volgende celdelingen gaan gepaard met de eerste differentiatie stappen waarbij de blastocyst (~300 – 400 celstadium) ontstaat, met een buitenste cellaag en een binnenste cellaag (inner cell mass) waaruit zich het embryo verder zal ontwikkelen. Tijdens deze vroege embryonale ontwikkeling worden ongeveer 3 - 8 cells apart gezet. Deze paar cellen dragen later bij aan de nieuwe kiembaan (studies bij muizen). Sorano and Jaenisch (1986) Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46: 19-29.
3. De frequentie van ernstige aangeboren afwijkingen komt ongeveer uit op 3-4 % van alle levend geboren kinderen. Dit getal is gebaseerd op verschillende grote studies in Engeland en Canada die uit de jaren zeventig stammen.
4. Het menselijk genoom is grotendeels in kaart gebracht. Het aantal genen op de genenkaart wordt geschat op zo'n 30.000 -35.000 genen, dit terwijl wij inmiddels ook weten dat de fruitvlieg al zo'n 16.000 genen lijkt te hebben. (2001) *Nature* 409:819.
5. Het Duchenne spierdystrofie heeft verschillende promotoren, Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kalan, J.C., Kahn, A., Berwalt-Netter, Y. (1990) Dystrophin gene transcribed from different promotors in neuronal and glial cells. *Nature* 344:64-65.
6. De norm ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratorie, officieel gedateerd op 15 december 1999. Zie ook de website van de RvA, Raad v Accreditatie (<http://www.rva.nl/nl/nart.html>).
7. Kaessmann, H., Paabo, S. (2002) The genetical history of humans and the great apes. *J Intern Med* 251:1-18.
8. Kan, Y.W. & Dozy A.M.(1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human Beta-globin gene: Relationship to sickle mutation. *Proc Nat Acad Sci USA* 75:5631-5635.
9. Human Gene Mapping 6. Oslo conference (1981). Sixth International Workshop on Human Gene Mapping. Abstract Pearson, P.L. and Bakker E. Localisation of 23 new RFLP markers.
10. Emery, A.E.H. (1993). Duchenne muscular Dystrophy. 2nd edition Oxford university press.
11. Wieacker, P., Davies, K.E., Pearson, P.L., Ropers, H.H. (1983) Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy by use of cloned DNA sequences. *Lancet* i: 1325-26.

12. Davies, K.E., Pearson. P.L., Harper, P.S., Murray, J.M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., Williamson, R. (1983). Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X-chromosome. *Nucl Acids Res* 11:2303-2312.
13. Bakker E., Hofker M.H., Goor N., Mandel J.L., Wrogeman K., Davies K.E., Kunkel L.M., Willard H.F., Fenton W.A., Sandkuijl L.A., Majoor-Krakauer D.F., Van Essen A.J., Jahoda M.G., Sachs E.S., Van Ommen G.J.B. and Pearson P.L. (1985) Prenatal diagnosis and carrier-detection of Duchenne Muscular Dystrophy with closely linked RFLP's. *Lancet* i:655-658.
14. Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.
15. Van Ommen, G.J.B, Verkerk J.H.M., Hofker M.H., Monaco A.P., Kunkel L.M., Ray P., Worton R.G., Wieringa B., Bakker E., Pearson P.L.(1986) A physical map of 4 million base pairs around the Duchenne muscular dystrophine gene on the human X-chromosome. *Cell* 47:400-504.
16. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res*;23:11141-1115. en Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. (1990) Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*;86:45- 48.
17. Zie figuur 3 in referentie 13.
18. Bakker, E., Van Broeckhoven, C., Bonten, E.J., Van de Vooren, M.J., Veenema, H., Van Hul, W., Van Ommen, G.J.B., Vandenbergh, A. and Pearson, P.L. (1987) Germline mosaicism and Duchenne Muscular Dystrophy mutations. *Nature* 329:554-556.
19. Bakker, E., Veenema, H., Den Dunnen, J.T., Van Broeckhoven, C., Grootsholten, P.M., Bonten, E.J., Van Ommen, G.J.B. and Pearson, P.L. (1989) Germinal mosaicism increases the recurrence risk for "new" duchenne muscular dystrophy mutations. *J.Med.Genet.* 26:553-559.
20. van der Riet, A.A., van Hout, B.A., Rutten, F.F. (1997) Cost effectiveness of DNA diagnosis for four monogenic diseases. *J Med Genet* 34:741-5.
21. Nelis, A. (1998) DNA-diagnostiek in Nederland, Proefschrift Universiteit Twente.
22. Sinds 1985 bestaat een landelijke registratie van families met erfelijke aanleg voor tumoren, opgezet door de Stichting Opsporing Erfelijke Tumoren (STOET).
23. Wijnen, J.Th., Vasen, H.F.A., Meera Khan, P. et al. (1998) Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *New Engl J Med* 339:511-518.
24. Vasen, H.F.A. (2000) Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Onc* 18S: 81-92.
25. Mozaïeken voor nieuwe mutaties komen in allerlei gradaties van vroeg in de embryogese waarbij een gecombineerd kiembaan en somatisch mozaïek ontstaat

en later in de embryogenese waarbij alleen een kiemcel of een somatisch mozaïek ontstaat. Leuer, M., Oldenburg, J., Laverne, L-M., Ludwig, M., Fregin, A., Eigel, A., Ljung, R., Goodeve, A., Peake, I., Olek, K. (2001) Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. *Am. J. Hum. Genet.*, 69:75-87.

Voor de de volgende aandoeningen (tabel 1) bestaat bewijs voor dit soort vroege opgetreden mozaïeken.

Tabel 1

X-gebonden	Dominant	Resesief
Duchenne spierdystrofie	Retinoblastoma	Osteogenesis Imperfecta
Hemofilie B	F10 deficientie	Cystic fibrose
Hemofilie A	Osteogenesis Imperfecta	PKU
FraX syndroom	FSHD	
Hunter syndroom	Myotone dystrofie	
X-SCID	Neurofibromatose	
Chron.Granulomateuze	B- Thalassemie	
Coffin Lowry Syndroom	Tuberosclerose	
Androgeen Receptor	Angelman syndroom	
Wiskot Aldridge Syndroom		

26. Het nieuw ontstaan van mutaties lijkt niet willekeurig te verlopen. In sommige genen bestaan zg. hotspots voor mutaties, vaak ontstaat een zelfde mutant telkens opnieuw. Talloze voorbeelden zijn hiervan bekend bijvoorbeeld in het FGFR3 gen treedt een puntmutatie 1138G>A (G380R ) regelmatig op en veroorzaakt kleingroei (Achondroplasie). In 80% van de patienten is de mutatie nieuw ontstaan.
27. Het gevoelig zijn voor het ontstaan van mutaties, kan voor een groot deel celtype en expressie afhankelijk zijn. Loping van enkelstengs DNA en reparatie van een vermeende mismatch kan leiden tot herhaaldelijk de zelfde mutatie. Kazazian, H.H.,Orkin, S.H., Boehm, C.D., Goff, S.C., et al. (1986) Characterization of a spontaneous mutation to a beta-thalassemia allele. *Proc Nat Acad Sci USA* 87:3924-3928. Hoewel dit nog nooit formeel bewezen is is het een plausibele verklaring, misschien zelfs t.g.v. homologie met verder weg gelegen of zelfs niet gekoppelde sequenties.
28. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) <http://www.emqn.org>
29. Losekoot, M., Bakker, E., Laccone, F., Stenhouse, S., Elles, R. (1999) A European pilot quality assessment scheme for molecular diagnosis of Huntington's disease. *Eur. J. of Hum. Genet.* 217-222.
30. Landelijk Overleg DNA-diagnostiek (LOD) <http://www.fdg.unimaas.nl/lof/lof.htm>
31. Gezondheidsraad advies: DNA-diagnostiek. Rapport nummer1998/11

32. European Patent Office (EPO) verleende Myriad Genetics het BRCA1 patent nummer 699 754 op 10 jan 2001 en het BRCA1 patent nummer 705 903 op 23 mei 2001.
33. In 1994, ruim voor de eerste priority date van het BRCA1 patent, werden er in ons DNA-diagnostisch laboratorium in nauwe samenwerking met de research groep van dr. P. Devilee draagsterschaptesten voor het BRCA1 gen uitgevoerd.
34. Cao, A., et al. (1996) Clinical experience of management of thalassemia: the Sardinian experience. *Sem. Hematol* 33:66-75.
35. Bakker, E., Pearson, P.L., Meera Khan, P., Schreuder, G.M.Th. and Madan, K. (1979) Orientation of major histocompatibility (MHC) genes relative to the centromere of human chromosome 6. *Clin.Genet.* 15:198-202.